

# 甘草多糖对人外周血 $\gamma\delta$ T 细胞的免疫调节作用

孙舒玉<sup>1</sup>, 何小鹏<sup>2</sup>, 柴旺<sup>1</sup>, 吕诚<sup>2</sup>, 吕爱平<sup>2</sup>, 喻长远<sup>1\*</sup>

(1. 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029;

2. 中国中医科学院中医临床基础医学研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**研究甘草多糖(Glycyrrhizae Radix et Rhizoma polysaccharide, GP)对人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞增殖、分泌细胞因子、杀伤肿瘤细胞的免疫调节作用。**方法:**采集正常人静脉抗凝血,加入淋巴细胞分离液,密度梯度离心法分离人单核细胞层,经 IPP 扩增后得到  $\gamma\delta$ T 细胞,采用不同质量浓度的甘草多糖(终质量浓度分别为 25, 50, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )。CCK-8 法检测甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响,ELISA 法检测甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞分泌干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的影响,CCK-8 法检测甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能的影响。**结果:**甘草多糖能促进  $\gamma\delta$ T 细胞增殖,呈剂量依赖关系;甘草多糖作用后, $\gamma\delta$ T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  明显增多( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖关系;甘草多糖作用后, $\gamma\delta$ T 细胞对肿瘤细胞 HepG2 的杀伤能力明显增强( $P < 0.05$ )。**结论:**甘草多糖能够促进人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞增殖、分泌细胞因子及杀伤肿瘤细胞,这为研究甘草多糖的抗肿瘤及免疫调节机制提供了新的依据。

**[关键词]** 甘草多糖;  $\gamma\delta$ T 细胞; 细胞增殖; 细胞因子; 细胞杀伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0242-04

## Immunoregulation Function of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Polysaccharide to $\gamma\delta$ T Cells from Human Peripheral Blood

SUN Shu-yu<sup>1</sup>, HE Xiao-juan<sup>2</sup>, CHAI Wang<sup>1</sup>, LV Cheng<sup>2</sup>, LV Ai-ping<sup>2</sup>, YU Chang-yuan<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China;

2. Institute of Basic Research in Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma polysaccharide (GP) on gamma delta T ( $\gamma\delta$ T) cells isolated from human peripheral blood. **Method:** Peripherals blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from peripheral blood of healthy donors by density gradient centrifugation on Ficoll-Hypaque.  $\gamma\delta$ T cells were amplified from PBMCs by IPP. Then  $\gamma\delta$ T cells were treated with different concentrations of GP (final concentrations: 25, 50, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). CCK-8 assay was performed to measure the proliferation of  $\gamma\delta$ T cells; ELISA assay was used to detect the concentrations of information- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) secreted by  $\gamma\delta$ T cells; cell counting kit 8 (CCK-8) assay was performed to measure the cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells. **Result:** The results showed that GP could promote  $\gamma\delta$ T cells proliferation in a dose-dependent manner; GP could also remarkably promote  $\gamma\delta$ T cells to secrete IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.01$ ); moreover, after being treated with GP, cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells to HepG2 cells was significantly improved ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The results indicated that GP was able to promote proliferation, cytokine secretion and cytotoxicity of  $\gamma\delta$ T cells, which provided new evidences for exploring anti-tumor and immunoregulation mechanism of GP.

**[收稿日期]** 20120803(004)

**[基金项目]** 科技部国家“重大新药创制”科技重大专项项目(2009ZX09502-019);国家自然科学基金(81001676,30902000);中国中医科学院自主选题(Z0195)

**[第一作者]** 孙舒玉, 硕士研究生, 从事药理学研究, Tel: 15201554471, E-mail: ssy\_1015@163.com

**[通讯作者]** \* 喻长远, 教授, Tel: 010-64448589, E-mail: yuchangy@sohu.com

[ **Key words** ] Glycyrrhizae Radix et Rhizoma polysaccharide;  $\gamma\delta$ T cells; proliferation; cytokine; cytotoxicity

甘草多糖 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma polysaccharide, GP) 是传统中药材甘草的主要活性成分之一,具有多种药理学功能。研究表明:甘草多糖能抑制肿瘤生长<sup>[1]</sup>;调节巨噬细胞活性<sup>[2]</sup>;抑制荷瘤鼠调节性 T 细胞的数目和功能<sup>[3]</sup>。 $\gamma\delta$ T 细胞是体内第一线防御细胞,在抗感染、抗肿瘤、免疫监视、免疫调节以及专职的抗原呈递方面都有着重要的作用。但到目前为止,还未见有甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞功能影响的报道。本研究选用人外周血来源的  $\gamma\delta$ T 细胞,通过增殖实验、杀伤实验、细胞因子检测来探讨甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞功能的影响。

## 1 材料

**1.1 细胞** HepG2 细胞(购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心)。

**1.2 药物与试剂** RPMI1640 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(Gibco 公司);双抗(Sigma 公司);淋巴细胞分离液(天津灏洋生物科技公司);异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP, Sigma 公司);甘草多糖(美国泛华公司,总多糖,由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、半乳糖、葡萄糖、4-O-甲基葡萄糖醛酸组成,其百分浓度分别为 35.87%, 6.39%, 28.22%, 6.75%, 22.23%, 0.56%; PE 标记的抗人  $\gamma\delta$ TCR 单抗(BioLegend 公司);CCK-8(日本同仁化学研究所);人干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ELISA 试剂盒(BioLegend 公司);人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒(BioLegend 公司)。

## 2 方法

**2.1  $\gamma\delta$ T 细胞的培养和鉴定** 采集正常人静脉抗凝血,加入淋巴细胞分离液,密度梯度离心分离单核细胞层。将收集到的细胞用 PBS 洗涤。用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^9$  cells/L,将重悬好的细胞加到 24 孔培养板中,1 mL/孔,并加入  $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  IL-2 和  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  环境培养,根据细胞生长状态每 1~3 d 换液或分孔。约 10~12 d 后,用 PE 标记的抗人  $\gamma\delta$ TCR 单抗及流式细胞仪分析所获  $\gamma\delta$ T 细胞的纯度为 87.8%

**2.2 对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响** 将从外周血中扩增的  $\gamma\delta$ T 细胞静息 48 h, PBS 洗涤后用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基重悬,以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞分别接种于 96 孔板,并加入不同质量浓度的甘草多糖

(终质量浓度分别为 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每组设 3 个复孔;同时设不加药物及无细胞的空白对照孔。 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 68 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8,继续培养 4 h。酶标仪测定波长为 450 nm 的吸光度(A)。并用以下公式计算增殖率:

$$\text{增殖率} = [(A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}}] \times 100\%$$

**2.3 对  $\gamma\delta$ T 细胞分泌细胞因子的影响** 将扩增的  $\gamma\delta$ T 细胞静息 48 h,洗涤后用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基重悬,以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞分别接种于 24 孔板,并加入甘草多糖质量终浓度分别为 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,同时设不加药物的对照孔。 $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 72 h。收集各组细胞上清液,测定各组细胞上清液中 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  的含量。方法均按 ELISA 试剂盒说明书进行,于酶标仪上测定 450 nm 的 A。

**2.4 对  $\gamma\delta$ T 细胞杀伤功能的影响** 收集传代培养的 HepG2 细胞作为靶细胞,用 PBS 洗涤 2 次后,重悬于含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基中,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,加入 96 孔板各孔中,100  $\mu\text{L}$ /孔。收集扩增的  $\gamma\delta$ T 细胞,静息 48 h 后,加入终浓度为 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甘草多糖, $37^\circ\text{C}$  孵育 24 h。收集经甘草多糖作用的  $\gamma\delta$ T 细胞作为效应细胞,调整细胞浓度,按  $\gamma\delta$ T 细胞:肿瘤细胞比分别为 5:1, 10:1, 20:1 加入 96 孔内。同时以不经甘草多糖刺激的  $\gamma\delta$ T 细胞作为对照,并设只有 HepG2 细胞及只有  $\gamma\delta$ T 细胞的对照孔。置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 8 h,用 CCK-8 法进行细胞毒活性分析,并按下列公式计算杀伤活性:

$$\text{细胞毒} = \frac{\text{靶细胞对照孔 } A - (\text{反应孔 } A - \text{效应细胞对照孔 } A)}{\text{靶细胞对照孔 } A} \times 100\%$$

**2.5 统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验和方差分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 3 结果

**3.1 对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响** 静息后的  $\gamma\delta$ T 细胞分别用终质量浓度为 25, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的甘草多糖刺激,用 CCK-8 掺入测定  $\gamma\delta$ T 细胞的增殖情况,其增殖率分别为  $(2.81 \pm 0.7)\%$ ,  $(5.5 \pm 1.58)\%$ ,  $(25.73 \pm 9.9)\%$ 。甘草多糖能促进  $\gamma\delta$ T 细胞增殖,且呈剂量依赖关系。见图 1。

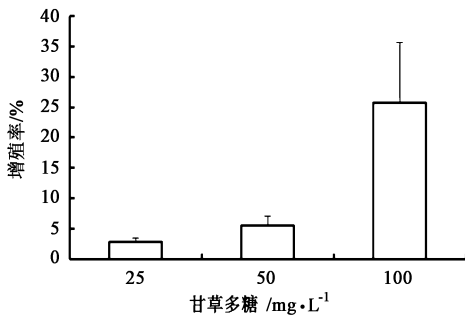
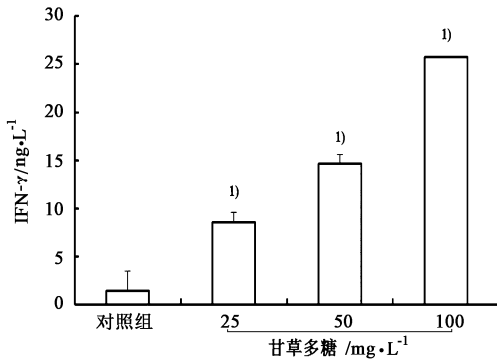


图 1 甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.2 对  $\gamma\delta$ T 细胞分泌 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  的影响** 终浓度为 25, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 的甘草多糖分别作用于  $\gamma\delta$ T 细胞, 其分泌的 IFN- $\gamma$  分别为 (1.45 ± 2.03), (8.54 ± 1.01), (14.62 ± 1.01), (25.76 ± 0.00) ng·L<sup>-1</sup>; TNF- $\alpha$  分别为 (12.07 ± 1.92), (17.82 ± 0), (27.39 ± 1.92), (35.05 ± 1.92) ng·L<sup>-1</sup>。甘草多糖作用后,  $\gamma\delta$ T 细胞分泌的 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  明显增多, 与对照组相比, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖关系。见图 2 ~ 3。



与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (图 3 同)

图 2 甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞分泌 IFN- $\gamma$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

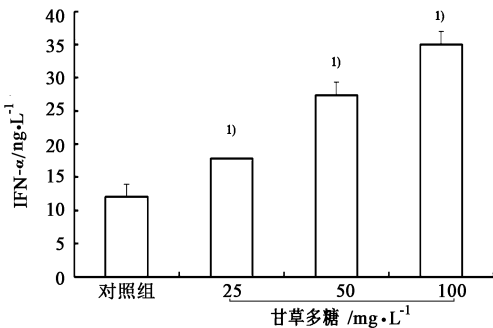
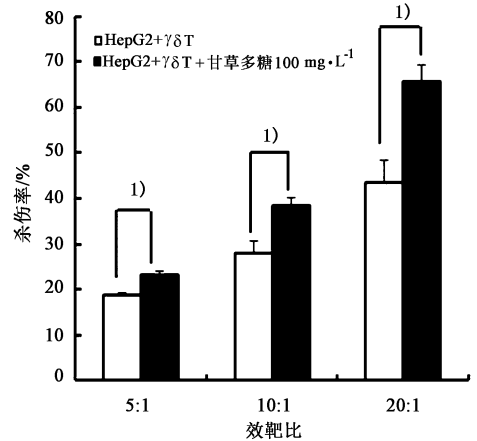


图 3 甘草多糖对  $\gamma\delta$ T 细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**3.3 对  $\gamma\delta$ T 细胞杀伤肿瘤细胞 HepG2 的影响** 已有文献证明,  $\gamma\delta$ T 细胞对多种肿瘤细胞系表现出明

显的杀伤活性<sup>[4-7]</sup>。本实验选用肝癌细胞 HepG2 作为靶细胞, 在 HepG2 +  $\gamma\delta$ T 细胞的效靶比为 5:1, 10:1, 20:1 的杀伤比分别为 (18.67 ± 0.65)%, (28.08 ± 2.66)%, (43.5 ± 4.73)%; 在 HepG2 +  $\gamma\delta$ T 细胞 + 甘草多糖 (100 mg·L<sup>-1</sup>), 效靶比为 5:1, 10:1, 20:1 的杀伤分别为 (23.14 ± 0.9)%, (38.51 ± 1.73)%, (65.61 ± 3.48)%。与对照组相比, 甘草多糖作用后,  $\gamma\delta$ T 细胞对 HepG2 的杀伤能力明显增强, 有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。见图 4。



与 HepG2 +  $\gamma\delta$ T 细胞相同效靶比组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 4 甘草多糖处理  $\gamma\delta$ T 细胞对其杀伤肿瘤细胞 HepG2 能力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

#### 4 讨论

$\gamma\delta$ T 细胞是一群特殊的 T 细胞, 是连接固有免疫和特异性免疫之间不可或缺的桥梁。它处于免疫防御系统的第一线, 在抗感染和抗肿瘤过程中起到重要的防御作用。 $\gamma\delta$ T 细胞识别的抗原范围广泛, 从小分子的磷酸抗原如 IPP 到大分子的蛋白质如 MICA (MHC class I-related A), T22, 线粒体 F1-ATPase 酶和载脂蛋白 A-I<sup>[8-11]</sup>。与  $\alpha\beta$ T 细胞不同,  $\gamma\delta$ T 能直接识别抗原, 不需要抗原处理和提呈过程, 没有 MHC 限制性。这使得其在识别抗原后能快速启动细胞免疫反应。本研究显示, 甘草多糖作用于  $\gamma\delta$ T 细胞后能促进其增殖, 并呈现剂量依赖性, 提示甘草多糖也是  $\gamma\delta$ T 所识别的抗原之一。

研究表明活化的  $\gamma\delta$ T 细胞可以对多种肿瘤细胞株产生明显的杀伤活性<sup>[4-7]</sup>, 且目前从肺癌, 胃癌, 肠癌, 乳腺癌, 卵巢癌及其他实体癌组织中均成功分离出  $\gamma\delta$ TIL 肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte)<sup>[12-14]</sup>, 充分说明了  $\gamma\delta$ T 细胞的抗肿瘤活性。它不仅能通过释放颗粒酶、穿孔素直接裂解靶细胞, 也能通过产生多种细胞因子参与免疫调节, 从而发挥间接杀瘤作用。在人外周血中, 大

于 90% 的  $\gamma\delta$ T 细胞属于 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 亚组<sup>[15]</sup>。本研究显示,在甘草多糖刺激下,人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞对肝癌细胞 HepG2 的杀伤作用显著增强,其分泌的细胞因子 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  也明显增多,进一步表明甘草多糖具有活化  $\gamma\delta$ T 细胞、增强其功能的作用。

多糖是一种具有多种生物活性的大分子物质,具有抗肿瘤、抗氧化等作用<sup>[16-18]</sup>,近年来研究证实,甘草多糖作为一种天然大分子化合物,具有抗氧化、抗感染、抗肿瘤等多种药理作用。本研究结果表明甘草多糖能促进人外周血  $\gamma\delta$ T 细胞增殖、分泌细胞因子及杀伤肿瘤细胞,这为甘草多糖的抗肿瘤及免疫调节机制研究提供了新的实验依据,其对  $\gamma\delta$ T 细胞更深入的作用机制有待于进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] 王忱,谢广茹,史玉荣,等. 甘草多糖的体内抑瘤作用及其机制的研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2003, 8(2): 85.
- [2] Cheng A, Wan F, Wang J, et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Glycyrrhiza uralensis* fish [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(1): 43.
- [3] He X, Li X, Liu B, et al. Down-regulation of Treg cells and up-regulation of Th1/Th2 cytokine ratio were induced by polysaccharide from *Radix Glycyrrhizae* in H22 hepatocarcinoma bearing mice [J]. Molecules, 2011, 16(10): 8343.
- [4] Guo B L, Liu Z, Aldrich W A, et al. Innate anti-breast cancer immunity of apoptosis-resistant human gammadelta-T cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 93(2): 169.
- [5] Liu Z, Guo B L, Gehrs B C, et al. *Ex vivo* expanded human Vgamma9Vdelta2 + gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro[J]. J Urol, 2005, 173(5): 1552.
- [6] Viey E, Fromont G, Escudier B, et al. Phosphostim-activated  $\gamma\delta$  T cells kill autologous metastatic renal cell carcinoma[J]. J Immunol, 2005, 174(3): 1338.
- [7] Corvaisier M, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells[J]. J Immunol, 2005, 175(8): 5481.
- [8] Bonneville M, Fourmié J J. Sensing cell stress and transformation through V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell-mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites [J]. Microbes Infect, 2005, 7(3): 503.
- [9] Zhao J, Huang J, Chen H, et al. V $\delta$ 1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: Molecular and biochemical evidences [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(1): 232.
- [10] Adams E J, Chien Y H, Garcia K C. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22 [J]. Science, 2005, 308(5719): 227.
- [11] Scotet E, Martinez L O, Grant E, et al. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I [J]. Immunity, 2005, 22(1): 71.
- [12] Chen J, Niu H, He W, et al. Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2001, 125(3): 256.
- [13] Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, et al. Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother, 2001, 50(3): 115.
- [14] Raspollini M R, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, et al. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma [J]. Ann Oncol, 2005, 16(4): 590.
- [15] Fisch P, Moris A, Rammensee H G, et al. Inhibitory MHC class I receptors on gamma delta T cells in tumour immunity and autoimmunity [J]. Immunol Today, 2000, 21(4): 187.
- [16] 朱侃,张颤,汪景,等. 仙鹤草多糖的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 188.
- [17] 王恩军,靳祎,王哲,等. 山茱萸多糖诱导宫颈癌细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 260.
- [18] 刘光建,王璐,王菲菲,等. 鱼腥草多糖对小鼠肝、肾、心肌和脑组织抗氧化作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 207.

[责任编辑 聂淑琴]